

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Experimentální Biologie Rostlin**

Doktorský studijní program: Anatomie a Fyziologie Rostlin

Autoreferát disertační práce



Efektory RAB GTPáz a jejich role v regulaci sekrece u rostlin

Mgr. Martina Růžicková

Školitel: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Školitel-konzultant: Doc. RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Praha, březen (2017)

Table of Contents

SOUHRN.....	3
ÚVOD.....	4
Rab GTPázy.....	4
Exocyst jako efektor Rab GTPáz.....	4
Proteiny umožňující funkci Rab GTPáz.....	5
REP adn GDI proteiny.....	5
Rab geranylgeranyl transferase.....	5
Klasifikace RAB GTPáz.....	5
CÍLE PRÁCE	6
1. Funkční charakteristika komplexu exocyst.....	6
2. Phenotype of exocyst mutants	6
MATERIÁL AND METODIKA	7
VÝSLEDKY	8
1. Plant Exocyst Complex is an Effector of small GTPases from RABA4 Class	8
2. Interakce EXO70A1 podjednotky exocystu s fosfolipidy in vitro	8
3. Developmental plasticity of Arabidopsis hypocotyl is dependent on exocyst complex function	8
4. Starch accumulation in Arabidopsis secretory mutants seedlings is a result of the cell wall biogenesis inhibition	9
5. Mutant in SEC15b exocyst subunit.....	9
6. Potenciál Rab GTPáz v rostlinných biotechnologiích.....	10
ZÁVĚRY	11
POUŽITÁ LITERATURA.....	12
Životopis	14

SOUHRN

Rab GTPázy jsou malé signální molekuly, které hrají důležitou roli ve váčkovém transportu. Jejich správné fungování umožňuje regulaci váčkového transportu mezi buněčnými organelami a také směrem do buněčné stěny, kdy je zdrojem materiálu pro růst a prodlužování buněk. Zapojení Rab GTPáz v regulaci endomembránového transportu je jeden z evolučně velmi konzervovaných aspektů řízení a kontroly sekrece. Mezi interaktory Rab GTPáz patří také různé 'downstream' efekторы. Jedním z nich je komplex exocyst, který je nejvíce známý pro své zapojení do váčkového transportu na plazmatické membráně. Tento komplex je složen z osmi různých podjednotek (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84) a byl objeven jako efektor Sec4p Rab GTPázy v kvasinkách. Dostupné informace z živočišných modelových organismů uvádějí SEC15 podjednotku jako podjednotku která interaguje s Rab GTPázami. Jaká je situace v rostlinách není dosud známo. Početné studie uvádějí důležitou funkci komplexu exocyst v 'tip growth' (vrcholový růst) pylových láček a kořenových vlásků, ve vytváření semenných obalů a také ve tvorbě buněčné přepážky, buněčné stěny a prodlužování hypokotylu. Také je známo zapojení komplexu exocyst v recyklaci auxinových přenašečů - PIN proteinů. V genomu *Arabidopsis* můžeme nalézt dva paralogy SEC15 podjednotky označované jako SEC15a a SEC15b z nichž, jak již bylo dříve ukázáno SEC15a podjednotka je důležitá pro polární růst pylové láčky.

V předkládané práci, jsme se nejdříve soustředili na konzervovanost interakce RAB GTPáz s komplexem exocyst v rostlině *Arabidopsis thaliana*. Použitím *in vitro* a *in vivo* metod, jsme ukázali interakci SEC15b podjednotky s RAB GTPázou z RAB-A4 podskupiny. Výsledky našich experimentů ukazují na fascinující možnost, že RAB GTPázy z RAB-A4 podskupiny nejsou v kontextu interakce s exocystem redundantní.

Protože dřívější výsledky ukázaly, že komplex exocyst je důležitý pro prodlužování buněk hypokotylu, které tvoří flexibilní spojení mezi kořenem a kotyledonovými listy, použili jsme tuto část etiolovaných semenáčů *Arabidopsis* jako modelový systém. Morfologické, anatomické a buněčné analýzy mutantů *Arabidopsis* v několika podjednotkách komplexu exocyst, zahrnující také SEC15 podjednotku, odhalily vytvoření odlišitelné části etiolovaného hypokotylu blízko rozhraní podzemní a nadzemní části rostliny.

Morfologicky se tento odlišný region podobal právě tomuto druhému rozhraní, které je důležitou přechodovou zónou mezi odlišnými prostředními a navzdory jeho klíčovému významu pro vývoj rostlin se málo ví o tom, jak je tato přechodová zóna determinována. Dále jsme také popsali a diskutovali další aspekty mutace SEC15b genu u *Arabidopsis* a redundanci obou SEC15 paralogů.

Homozygotní mutantní rostliny *rgtb1-1*, které jsou defektivní v enzymu RAB geranylgeranyláze jsou charakteristické krátkými etiolovanými hypokotily s nepravidelným buněčným uspořádáním a akumulací škrobu. Pro uchopení tohoto jevu jsme použili etiolované hypokotily *Arabidopsis* divokého typu (WT) opůsobené isoxabenem. Rostliny pěstované na médiu se sacharózou reagovaly na porušení buněčné stěny alokací cukrů a jejich uložením ve formě škrobu. Dále jsme také použili různé mutantní linie defektní v buněčném transportu, které vykazovaly stejný fenotyp jako WT rostliny opůsobené isoxabenem. Objevili jsme, že existuje kontrolní mechanismus který přepíná mezi využitím cukrů pro syntézu buněčné stěny a nebo jejich uložením ve formě škrobu.

Na konci celé práce také diskutujeme možnosti použití Rab GTPáz v biotechnologiích.

ÚVOD

Celý proces váčkového transportu začíná pučením váčku, které je umožněno narušením donorové membrány a poháněno tvorbou obalu transportního váčku. Jsou známy nejméně tři typy proteinů, které reverzně polymerizují a tvoří tento transportní obal váčku. V anglickém jazyce jsou nazývány „coatomers“. Prvním typem jsou váčky, které se pohybují od plazmatické membrány a TGN oddíl směrem do vakuoly a jsou obalené proteinem clathrinem. COPI protein obaluje druhý typ váčků, které jsou transportovány mezi ER a Golgi organelami. A třetím typem jsou váčky, které zprostředkovávají „retrográdní“ transport váčků mezi ER a Golgi a jsou obalené proteinem COPII. Skládání těchto, váček obalujících, proteinů je regulováno GTP-vazebnými proteiny (Arf, Sar a také Rab proteiny).

Dalším krokem vezikulárního transportu je transport váčku během něhož jsou vytvořené váčky transportovány směrem k plazmatické membráně. Proces dopravy váčku je zprostředkován aktinovými vlákny a mikrotubuly (cytoskeletem), který usnadňuje pohyb váčku. Vysoká specifita interakce různých molekulárních motorů s cytoskeletem je během tohoto procesu nezbytností a je zajištěna Rab GTPázami (Seabra and Coudrier, 2004). Předtím než váček splyne s membránou dojde ke ztrátě jeho obalu, který by mohl negativně ovlivnit proces fúze membrán. I během ztráty obalu hrají Rab GTPázy důležitou roli. U živočichů je například tento proces regulován Rab5 GTPázou (Semerdjieva et al., 2008).

Když je transportovaný váček ve vzdálenosti přibližně 40 - 50 nm od cílové membrány, Rab GTPázy aktivují „tethering“ komplexy, které přiblíží váček ještě blíže k cílové membráně. Posledním krokem je poté fúze váčku s cílovou membránou, která je zajištěna interakcí s N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptorem, který je známý také jako SNARE complex.

Rab GTPázy

Rab GTPázy jsou malé monomerní G proteiny, jejichž role je regulace váčkového transportu v buňce. Rab GTPázy patří do proteinové nadrodiny Ras, spolu s dalšími signálními proteiny rodiny Ras, Ran, Rho a Arf, které mají stejnou katalytickou aktivitu a strukturní rysy, ale liší se svou funkcí v buňce.

Jako molekulární „switch“, Rab GTPázy přecházejí mezi dvěma stavy, GTP-vazebným a GDP-vazebným stavem. GTP-vazebný stav je považován za aktivní formu GTPázy, kdežto GDP-vázající GTPáza je považována za neaktivní (Stenmark et al. 1994). Změna Rab GTPázy z GDP na GTP-vazebnou formu vyžaduje regulační proteiny, které jsou nazývány „Guanine nucleotide Exchange Factors“ (GEFy). Když je Rab GTPáza aktivní může interagovat se svými efektorovými proteiny (například „tethering“ factory).

Ikdyž je Rab GTPáza schopna sama hydrolyzovat GTP není v tom velmi efektivní (Pan et al. 2006). Proto jsou v buňce další regulační proteiny – „GTPase Activating proteins“ (GAPy), které umožňují efektivnější hydrolýzu GTP a tím mohou i samotné Rab GTPázy regulovat.

Exocyst jako efektor Rab GTPáz

Exocyst je multiproteinový kotvící komplex, který je vysoce konzervovaný napříč téměř celou eukaryotickou říší (Heider et al. 2012a byl poprvé objeven jako efektor Rab GTPáz u kvasinek (TerBush et al. 1996). Tento komplex funguje na vzdálenost přibližně 40-50 nm od membrány. Na tuto vzdálenost zachytává sekretorické váčky a přibližuje je k membráně a to na asi 10nm. Tímto se dostává transportní váček do blízkosti SNARE proteinů, které zprostředkovávají vlastní fúzi váčku s membránou (Chen et al. 2001).

Proto aby mohl komplex exocysz v buňce plně fungovat musí proběhnout následující kroky. Musí vytvořit funkční komplex v místě kde má dojít k fúzi, musí být schopen interagovat s cílovou membránou a musí být schopen interagovat s transportním váčkem. Posloupnost těchto kroků není dosud známa.

Proteiny umožňující funkci Rab GTPáz

REP adn GDI proteiny

Tyto dva proteiny jsou součástí Rab GTPázového cyklu a mezi sebou jsou navzájem velmi podobné a příbuzné (Seabra et al. 1998). GDI a REP proteiny jsou důležité nejen během posttranslační modifikace Rab GTPáz která je zprostředkována Rab geranylgeranyl transferázou (RabGGT), ale také pomáhají Rab GTPázám dokončit celý GDP-GTP cyklus.

Rab geranylgeranyl transferase

RabGGT je unikátní prenyl transferáza, která modifikuje pouze členy jedné proteinové podrodiny - Ras-příbuzných Rab GTPáz.

Většina z těchto Rab GTPáz má na C-konci dvě cysteinová rezidua uspořádaná do motivů jako jsou -CC, -CXC, -CCX, -CCXX a RabGGT enzym katalyzuje přenos dvou geranylgeranyl skupin na tyto dva cysteiny (Farnsworth et al. 1994). Proces geranzlgeranzlace Rab GTPáz vyžaduje přítomnost REP proteinu a Anant et al. (1998) použil pro tento proces označení –prenylační kaskáda.

tato kaskáda začíná právě REP proteinem, který váže nově syntetizovaný Rab protein and vytváří stabilní Rab-REP komplex. RabGGT enzym je následně schopný rozpoznat Rab-REP komplex jako svůj substrát a zprostředkuje přenos geranylgeranylového zbytku na odpovídající cysteinová rezidua.

po této posttranslační modifikaci je Rab GTPáza schopna vázat biologické membrány (Alexandrov et al. 1994).

Klasifikace RAB GTPáz

Rab GTPázy můžeme nalézt u téměř všech eukaryot. U kvasinek jsou Rab GTPázy pojmenovávány historicky – vzhledem k jejich objevení. U drozofily a živočichů je klasifikace číselná a u *Arabidopsis thaliana* je klasifikace založena na písmenech abecedy a obsahuje písmena A až H (Rutherford et al. 2002).

V genomu *Arabidopsis* bylo identifikováno 57 RAB GTPáz (Pereira-Leal et al. 2001) které jsou rozděleny do 8 skupin (Bischoff et al. 1999), z nichž 6 je příbuzných Rab GTPázám kvasinek a jiných živočichů. Zbývající dvě skupiny jsou příbuzné Rab2 a Rab18 podskupinám živočichů které nemají své ekvivalenty u kvasinek (Lazar et al. 1997). V této práci jsme se soustředili na RAB GTPázy, které hrají roli ve váčkovém transportu směrem k plazmatické membráně, což znamená na ty, které jsou součástí prvních šesti skupin.

CÍLE PRÁCE

Ph.D. práce: „Efektory rab GTPáz a jejich role v rostlinné sekreci“ má dva hlavní cíle, které jsou podrobněji rozepsané v této kapitole. První cíl se zaměřuje na komplex exocyst na molekulární úrovni a snaží se odpovědět na otázku funkční charakteristiky. druhá část je zaměřena na fenotypový efekt mutace v jednotlivých podjednotkách komplexu exocyst. tento druhý cíl byl řešen hlavně z pohledu fyziologie.

1. Funkční charakteristika komplexu exocyst

Interakce komplexu exocyst se sekrečním váčkem

- jak je zprostředkováno spojení mezi „tethering“ komplexem exocyst a sekrečním váčkem?

Interakce komplexu exocyst s plazmatickou membránou

- Jakým způsobem interaguje podjednotka EXO70A1 komplexu exocyst s fosfolipidy membrány?

2. Phenotype of exocyst mutants

Plasticita hypokotylu mutantů v podjednotkách komplexu exocyst

- IsJe zde společný sekreční fenotyp pro mutanty v odlišných podjednotkách komplexu exocyst?

Specifická akumulace škrobu v hypokotylech ve tmě rostoucích mutantů v komplexu exocyst

- Mají sekreční mutanti problém s elongací hypokotylu a nadměrnou akumulací škrobu když rostou ve tmě? Rozhoduje se rostlina mezi růstem a ukládáním. ‚To grow or to store‘?

Mutant v SEC15b podjednotce komplexu exocyst

- Jak vypadá mutant v SEC15b podjednotce komplexu exocyst?

MATERIÁL AND METODIKA

Přehled materiálu a metod použitých v této Ph.D.práci

- *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*,
- *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*
- klonování genů a příprava konstruktů
- Dvouhybridní kvasinkový systém (Y2H)
- Kvasinková komplementace
- koimmunoprecipitace
- exprese a purifikace proteinů
- pull-down a western blot analýzy
- PIP/Lipid membránové proužky, metoda „Large Unilamellar Vesicles“ (LUV)
- Barvení Lugolovým roztokem, Kit na detekci škrobu (Abcam),
- mikroskopie, fluorescenční mikroskopie FLIM/FRET
- ImageJ, Inkscape, GIMP programy.

VÝSLEDKY

1. Plant Exocyst Complex is an Effector of small GTPases from RABA4 Class

Martina Růžicková^{1,2,3}, Klára Aldorfová^{1,2}, Viktor Žárský^{1,2} and Michal Hála^{1,2*}

Souhrn:

Zapojení Rab GTPáz v regulaci endomembránového transportu je jeden z evolučně konzervovaných aspektů sekrece. RAB GTPázy jsou signální molekuly, které regulují váčkový transport mezi buněčnými endomembránovými kompartmenty a také mezi kompartmenty a plazmatickou membránou a to pomocí jejich „down-stream“ efektorů.

Jedním z těchto efektorů je exocyst komplex, který umožňuje první kontakt váčku s plazmatickou membránou. Exocyst se skládá z osmi odlišných podjednotek (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84) a je přítomen téměř u všech eukaryot. Exocyst byl objeven jako efektor Sec4p Rab GTPázy v kvasinkách a také další data z živočišných modelových organismů ukazují interakci SEC15 podjednotky s Rab GTPázou. U rostlin zatím nebyla tato interakce komplexu exocyst s Rab GTPázou potvrzena.

V této práci jsme se zaměřili na konzervovanost interakce exocyst-Rab GTPáza v rostlině *Arabidopsis thaliana*. Exprimovali jsme SEC15b podjednotku, jeden ze dvou paralogů této podjednotky komplexu exocyst, ve formě rekombinantního proteinu a také tranzientně jako GFP-SEC15b fúzní protein v *Nicotiana benthamiana*.

Oba přístupy *in vitro* i *in planta* ukázaly interakci SEC15b podjednotky s RAB GTPázou z podskupiny RAB-A4. Velmi zajímavý byl výsledek kdy se SEC15b podjednotkou interagovaly RAB-A4a a -A4b a další dvě Rab GTPázy ze stejné podskupiny, RAB-A4c and -A4d, se ukázaly jako interakčně.

2. Interakce EXO70A1 podjednotky exocystu s fosfolipidy *in vitro*

Jakým způsobem interaguje EXO70A1 podjednotka s fosfolipidy?

Interakce komplexu exocyst s fosfolipidy plazmatické membrány je velmi aktuální téma řešené v naší laboratoři.

EXO70A1 podjednotka je exprimovaná napříč všemi rostlinnými tkáněmi (Synek et al., 2006). Její interakce s fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PI4,5P2) fosfolipidem na plazmatické membráně byla ukázána na kvasinkovém modelu (He et al., 2007).

Mým úkolem bylo exprimovat a purifikovat konstrukt Exo70A1 a mutovanou verzi s bodovými mutacemi - Exo70A1-5xE a otestovat její schopnost a specifitu vázat fosfolipidy. Pro první analýzu, která měla potvrdit nebo vyvrátit možné spojení mezi EXO70A1 podjednotkou a fosfolipidy, byla použita metoda PIP strip. Za nativních podmínek byl purifikován konstrukt EXO70A1 s His-kotvou na N-konci a použit na PIP strip analýzu. Proteinově specifický signál byl detekován pomocí protilátky proti His-kotvě.

3. Developmental plasticity of *Arabidopsis* hypocotyl is dependent on exocyst complex function

Edita Janková Drdová^{1,2}, Martina Růžicková^{1,2}, Karel Janko³, Michal Hála^{1,2}, Hana Soukupová¹ and Viktor Žárský^{1,2}

Abstract:

Rozhraní kořen-hypokotyl, je důležitou tranziční zónou mezi odlišnými prostředími. Navzdory tomu jak je toto rozhraní důležité pro správný vývoj rostliny je o něm velmi málo známo. Zapojení komplexu exocyst v tomto procesu popisuje následující práce. Exocyst je osmipodjednotkový váčkový kotvící komplex uplatňující se v sekreci a recyklaci membrán, ve vrcholovém růstu pylových láček a kořenových vlásků, formování semenných obalů, tvorbě buněčné přepážky a buněčné stěny, prodlužování hypokotylu a obraně rostlin. Důležitá je také jeho funkce v recyklaci PIN proteinů (auxinových přenašečů), které jsou důležité pro polární transport auxinu. V této práci jsme pomocí morfologických, anatomických a také buněčných analýz *Arabidopsis* mutantů v několika podjednotkách komplexu exocyst poukázali na zajímavý fenotyp, který se týká části etylovaného hypokotylu nad pravým rozhraním kořen-hypokotyl. Morfologicky se tato oblast podobá pravému rozhraní. Projev tohoto zajímavého fenotypového defektu je podmíněn kultivačními podmínkami – teplotou a přítomností cukrů v médiu. Vliv inhibitoru auxinu na projev tohoto znaku byl také zjištěn. U studovaných mutantních rostlin byla také snížena indukce adventivních kořenů.

Tato pozorování přináší nový pohled na regulaci vývoje a celkové plasticity hypocotylu *Arabidopsis thaliana*.

4. Starch accumulation in *Arabidopsis* secretory mutants seedlings is a result of the cell wall biogenesis inhibition

Martina Růžicková^{1,2,3}, Edita Drdová¹, Hana Soukupová¹, Viktor Žárský^{1,2} and Michal Hála^{1,2*}

Tvorba buněčné stěny rostlin je velmi komplexní proces. Buněčná stěna reprezentuje důležitý rezervoár cukrů ve formě sacharidů z kterých je složena. Pro správné utváření buněčné stěny a prodlužování a růst buněk obecně, je velmi důležitá funkční sekrece. V této práci jsme si položili otázku jak se rostliny s poškozenou sekrecí vyrovnávají s nahromaděnou energií ve formě polysacharidů.

Abychom mohli odpovědět na tuto otázku, použili jsme hypocotyl *Arabidopsis*, které tvoří flexibilní spojení mezi kořenem a kotyledonovými listy, jako modelový systém. Pokud jsou rostliny pěstovány ve tmě, buňky hypocotylu prodělávají rapidní prodlužování a během tohoto procesu probíhá intenzivní transport do buněčné stěny. Sekreční mutanti, které jsme v této práci použili jsou charakterističtí krátkými etylovanými hypocotyl s nepravidelným buněčným uspořádáním a ektopickou akumulací škrobu. Analyzovali jsme tedy délku hypocotylů sekrečních mutantů pěstovaných ve tmě a porovnali jsme ji s rostlinami divokého typu (WT) pěstovaných za stejných podmínek. Poté jsme provedli srovnávací analýzu délky hypocotylu s akumulací škrobu. Podobnou srovnávací analýzu jsme provedli s WT rostlinami pěstovanými na médiu s přidaným isoxabenem.

Etylované hypocotyl WT rostlin, pěstovaných na médiu obsahující sacharózu, reagovaly na opůsobení isoxabenem a tím rozrušení buněčné stěny uložením cukrů ve formě škrobu. Což je efekt srovnatelný s akumulací škrobu u sekrečních mutantů. Na základě našich pokusů jsme také navrhli existenci přepínacího mechanismu, který rozhoduje zda se dostupný cukr použije na stavbu buněčné stěny anebo se uloží ve formě škrobu.

5. Mutant in SEC15b exocyst subunit

Jak vypadá mutant v SEC15b podjednotce komplexu exocyst?

Ze SALK kolekce jsme objednali následující mutantní linie : SALK_130663, SALK_042723 and RIKEN_RATHM15-1183-1_H.

Tyto linie byly odkříženy do Col0 WT rostlin a genotypovány na T-DNA nebo transpozonální inzerci. Inzerce v SEC15b genu a v SEC15b promotoru byla potvrzena ve dvou *Arabidopsis* liniích (SALK_130663 and RATHM15-1_H). A tyto dvě potvrzené linie byly dále používány. První genotypování RATHM-1183-1_H linie ukázalo existenci *sec15b* homozygotních rostlin, které nevykazovaly žádný viditelný fenotyp. Ten se však projevil po prvním odkřížení do pozadí Col0 WT rostliny. Mutantní linie s inzercí T-DNA SALK_130663 byla genotypována a v populaci 320 rostlin bylo nalezeno 51 rostlin homozygotních které měz viditelný fenotyp. Fenotyp byl viditelný na 4 týdny starých rostlinách v období kdy rostliny přecházejí z vegetativní do generativní fáze. Rostliny měly porušenou apikální dominanci a dosahovaly jen poloviční výšky WT rostliny. Na listech byly navíc viditelné léze, které by mohly mít autofagický původ.

Fenotyp ve tmě pěstovaných *sec15b* mutantních rostlin byl viditelný okamžitě. Semenáče nebyly schopné prodlužovat hypokotyl a vytvářely druhé falešné rozhraní kořen-hypokotyl. Tento fenotyp ektopického druhého rozhraní byl také pozorován u mutantů v dalších exocystích podjednotkách a detailněji je popsán v publikaci „Developmental plasticity of *Arabidopsis* hypocotyl is dependent on exocyst complex function“, která je také součástí této dizertační práce. *sec15b* mutantní rostliny vykazovaly také akumulaci škrobu v poškozené části hypokotylu. Akumulací škrobu a jeho vztahu k délce hypokotylu se zabývá příložený manuskript „Starch accumulation in *Arabidopsis* secretory mutants seedlings is a result of the cell wall biogenesis inhibition“.

sec15b homozygotní rostliny, SALK i RIKEN linie, byly potvrzeny jako knock-out linie.

6. Potenciál Rab GTPáz v rostlinných biotechnologiích

Martina Růžicková^{1,2} and Michal Hála*^{1,2}

Rostliny poskytují lidstvu nejenom potravu, ale jsou i cenným zdrojem surovin pro různá odvětví průmyslu. Rostlinné biotechnologie pomáhají zlepšovat výnosy jak potravin, tak surovin získávaných z rostlin a také rozšiřovat jejich spektrum. Jedním z nástrojů je ovlivňování buněčného sekrečního aparátu.

Rab GTPázy mají důležitou funkci právě při organizaci váčkového transportu, důležité je zejména jejich cyklování mezi různými formami s navázaným GDP či GTP a také mezi různými membránovými kompartmenty. Jak název naší práce napovídá, chceme zvážit možné využití RAB GTPáz v biotechnologiích. V naší práci ukazujeme na vybraných příkladech z literatury úlohu RAB GTPáz v odpovědích rostlin na stres a ve tvorbě buněčné stěny u rostlin, což jsou procesy zásadně ovlivňující rostlinnou produkci.

Naším závěrem je, že využití RAB GTPáz v biotechnologiích by bylo možné ale, vzhledem k dosud ne zcela probádané a velmi komplexní síti regulací, vyžaduje další výzkum.

ZÁVĚRY

Celá dizertační práce je hlavně zaměřena na komplex exocyst jako na efektor RAB GTPáz. Do větších podrobností jsme objevili a diskutovali aspekty mutace v různých podjednotkách komplexu exocyst a jejich spojení s RAB GTPázami. Pozorovali jsme také akumulaci škrobu jako fenotyp mutantů v komplexu exocyst a spojili jsme jej s cukerným metabolismem.

1. První část práce je zaměřena na funkční charakteristiky komplexu exocyst. Obzvláště jsme se zaměřili na popsání interakce komplexu exocyst s transportním váčkem a na to jak je tato interakce zprostředkována. I když byla tato interakce dříve popsána u jiných organismů, situace u rostlin nebyla známa. I přes naše předešlé neúspěšné pokusy najít interakčního partnera exocystu mezi RAB GTPázami jsme stále uvažovali dvě různé možnosti. Přímoou interakci exocystu s fosfolipidy váčku i nepřímou interakci s RAB GTPázami. Použitím metody koimunoprecipitace a pull-down metody jsme našli dva interakční partnery mezi RAB GTPázami ze skupiny A Rab GTPáz. Navíc můžeme říct, že SEC15b podjednotka komplexu exocyst není schopna interagovat s fosfolipidy membrány. Tohoto výsledku bylo dosaženo použitím metody PIP strip. Výše zmíněné výsledky ukazují na konzervovanost komplexu exocyst, kde tento interaguje s transportním váčkem přes RAB GTPázy.

2. Také další podjednotky komplexu exocyst jsme testovali na interakci s fosfolipidy. Vybrali jsme EXO70A1 podjednotku, která spolu se SEC3 podjednotkou zprostředkovává interakci s fosfolipidy u jiných eukaryot. Naše výsledky ukazují, že EXO70A1 podjednotka interaguje s fosfolipidy. Tato interakce je navíc preferenční pro kyselinu fosfatidovou (PA) a byla testována *in vitro*. Tento experiment je součástí dizertační práce a bude také zahrnut v publikaci o komplexu exocyst a jeho interakcích s membránami. Samozřejmě jsme si vědomi toho, že tyto výsledky získané *in vitro* musí být potvrzeny také *in vivo* nebo lépe *in planta* abychom byli schopni objasnit celý mechanismus. Je tudíž nezbytné srovnat a potvrdit naše získané výsledky s dalšími studiemi *in vivo*.

3. Druhá část dizertační práce je zaměřena na aspekty mutace různých podjednotek komplexu exocyst. Tohoto tématu se týkají dva manuskripty. První manuskript se zaměřuje na zatím neznámý fenotypový defekt, který je velmi specifický a podmíněný podmínkami prostředí. Je lokalizován na rozhraní kořenu a hypokotylu u rostlin pěstovaných ve tmě.

4. Druhý manuskript vychází z pozorování manuskriptu prvního a zaměřuje se na aspekty akumulace škrobu v hypokotylech ve tmě pěstovaných sekrečních mutantů. Výsledky zpracované v tomto manuskriptu ukazují, že v rostlině existuje rozhodovací mechanismus „ukládat nebo růst“.

5. Poslední část předkládané práce se soustředí na rostlinu *Arabidopsis thaliana* mutantní v SEC15b podjednotce komplexu exocyst. Tento výsledek bude také součástí publikace.

POUŽITÁ LITERATURA

Alexandrov K., Horiuchi H., Steele-mortimer O., Seabral M. C., and Zerial M. (1994). "Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes". In: *EMBO J* 13.22, pp. 5262–5273.

Anant J. S., Desnoyers L., Machius M., Demeler B., Hansen J. C., Westover K. D., Deisenhofer J., and Seabra M. C. (1998). "Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex." In: *Biochemistry* 37.36, pp. 12559–12568.

Bischoff F., Molendijk A., Rajendrakumar C., and Palme K. (1999). "GTP-binding proteins in plants." In: *Cell Mol Life Sci* 55.2, pp. 233–256.

Farnsworth C. C., Seabrat M. C., Ericsson L. H., Gelbt M. H., John A., and Imi G. (1994). "Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A." In: *PNAS* 91.25, pp. 11963–11967.

He B., Xi F., Zhang X., Zhang J., and Guo W. (2007). "Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane". In: *The EMBO journal* 26.18, pp. 4053–4065.

Heider M. R. and Munson M. (2012). "Exorcising the exocyst complex". In: *Traffic* 13.7, pp. 898– 907.

Chen Y. A. and Scheller R. H. (2001). "SNARE-mediated membrane fusion". In: *Nature reviews Molecular cell biology* 2.2, pp. 98–106.

Lazar T., Gotte M., and Gallwitz D. (1997). "Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?" In: *Trends Biochem Sci* 22.12, pp. 468–472.

Pan X., Eathiraj S., Munson M., and Lambright D. G. (2006). "TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism". In: *Nature* 442.7100, pp. 303–306.

Pereira-Leal J. and Seabra M. (2001). "Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins." In: *J Mol Biol* 313.4, pp. 889–901.

Rutherford S. and Moore I. (2002). "The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation". In: *Current Opinion in Plant Biology* 5.6, pp. 518–528.

Seabra M. C. (1996). "Nucleotide Dependence of Rab Geranylgeranylation Rab escort protein interacts preferentially with GDP-bound Rab". In: *Journal of Biological Chemistry* 271.24, pp. 14398–14404. — (1998). "Membrane Association and Targeting of Prenylated Ras-like GTPases". In: *Cell Signal* 10.3, pp. 167–172.

Seabra M. C. and Coudrier E. (2004). "Rab GTPases and myosin motors in organelle motility". In: *Traffic* 5.6, pp. 393–399.

Semerdjieva S., Shortt B., Maxwell E., Singh S., Fonarev P., Hansen J., Schiavo G., Grant B. D., and Smythe E. (2008). "Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6". In: *The Journal of cell biology* 183.3, pp. 499–511.

Stenmark H., Parton R. G., Steele-Mortimer O., Lütcke A., Gruenberg J., and Zerial M. (1994). "Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis." In: *The EMBO journal* 13.6, p. 1287.

Synek L., Schlager N., Eliáš M., Quentin M., Hauser M.-T., and Žárský V. (2006). "AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development". In: *The Plant Journal* 48.1, pp. 54–72.

TerBush D. R., Maurice T., Roth D., and Novick P. (1996). "The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*." In: *The EMBO journal* 15.23, p. 6483.

Martina Růžicková – Životopis

Osobní informace:

Email	Martina.Ruzickova@glasgow.ac.uk
Phone number	+420 776 570 858
Address	Uherský Brod 3 – Újezdec Kříby 308 687 34

Oblast výzkumu:

Rostlinná buněčná biologie je oblast výzkumu ve které bych chtěla dále rozvíjet svoje schopnosti a znalosti. Během svého Ph.D. studia jsem měla to štěstí pracovat na membránovém transportu a buněčné signalizaci, což jsou pro mne velmi zajímavá témata. Jsme odhodlaná pokračovat ve své kariéře jako “postdoctoral researcher” a rozšířit svůj zájem na různá vědecká témata, přístupy a techniky.

Education and Employment:

- 2017 – present:** **Vědecký asistent**, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom . Laboratory of Plant Physiology and Biophysics. Hlavní zájem: membránový transport, elektrofyziologie.
- 2011 – 2017:** **Ph.D. studium**, Karlova Univerzita, Praha, Česká republika. Laboratoř buněčné biologie. Ph.D. práce: Interaktory RAB GTPáz a jejich role v buněčné sekreci.
- 2010 – 2011** **Vědecká stáž**, Karlova Univerzita, Praha, Česká republika. Laboratoř biochemie RNA. Projekt: HCV a cap nezávislá iniciace translace po vazbě ribozomu to the internal ribosome entry site.
- 2007 – 2010** **Mgr. Molekulární biologie a genetika**, Masarykova Universita, Brno, Česká republika. Národní centrum pro výzkum biomolekul, Magisterská práce: Příprava a charakterizace vybraných proteinů zahrnutých v degradaci RNA.
- 2003 – 2007** **Bc. Obecná biologie** – Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Česká republika. Laboratoř rostlinné virologie. Bakalářská práce: PCR dekce fytoplazem v indikátorovém hostiteli *Catharanthus roseus*.

Publikace a manuskripty:

- Molecular identification of phytoplasmas in cultivar collection and production plantations of apple and pear trees in the Czech republic. Fránová J., Petržík K., Růžičková M., Paprštejn F., Kučerová J. (2008). Acta Horticulturae, 781: 359-368.
- Developmental plasticity of Arabidopsis hypocotyls is dependent on exocyst complex function. Janková-Drdová E., Růžičková M., Janko K., Hála M., Soukupová H., Žárský V. , Prepared for re-submission. Expected 2016.
- Analysis of hypocotyls length and starch accumulation in dark-grown Arabidopsis plants under the isoxaben treatment. Růžičková M., Janková-Drdová E., Žárský V. and Hála M., manuscript in preparation. Expected 2017.
- Molecular Molecular mechanism of SEC15B function is evolutionary conserved and involve interaction with RAB GTPases. Růžičková M., Aldorfová K., Žárský V. and Hála M., Expected 2017.
- Characterization of SEC15b subunit of the exocyst complex. Aldorfová K. and Růžičková M., Žárský V., Hála M. Expected 2017.
- Interaction of the EXO70A1 exocyst subunit with the plasma membrane in plant cells. Synek L., Pleskot R., Růžičková M., Vukašinovič N., Žárský V., Potocký M. Expected 2017.

Konference a kurzy:

- Září 2016, European Network for Plant Endomembrane Research Meeting (ENPER), Bordeaux, Francie, Poster.
- Červenec 2015, Society of Experimental Biology Conference in Prague, Praha, Česká republika, Poster.
- Září 2014, European Network for Plant Endomembrane Research Meeting (ENPER), Lecce, Itálie, přednáška.
- Září 2014, 12th PhD Student Conference of Plant Experimental Biology, Olomouc, Česká republika, přednáška.
- Říjen 2012, 15th European Network for Plant Endomembrane Research Meeting (ENPER), Madrid, Španělsko, přednáška.

- Březen 2011, The Student Scientific Conference on Biotechnology and Biomedicine, Brno, Česká republika, přednáška.
- Září 2011, Cell Section Symposium: Exocytosis in Animals, Fungi and Plants, Londýn, Velká Británie, Poster.
- Září 2006, XVII. Česká a Slovenská konference, Praha, Česká republika, přednáška.
- Září 2012, Proteomika v praxi, Brno, Česká republika. Kurz 2DE a charakterizace proteinů pomocí MS.

Teaching:

2011 - 2016 vedení bakalářských a magisterských studentů.

2012 - 2014 Praktický kurz rostlinné fyziologie (semestrální turnusová praktika na přírodovědecké fakultě, Karlova Univerzita, Praha).

Laboratorní dovednosti:

- Kultivace a práce s modelovými organismy (rośliny, kvasinky, bakterie)
- Molekulárně biologické metody (klonování, izolace DNA a RNA, PCR, Southern blot, RT qPCR, Northern blot)
- exprese proteinů v bakteriích a kvasinkách, purifikace a renaturace
- Metody proteinové chemie (SDS-PAGE, Nativní a 2D- elektroforéza, Western Blotting)
- Protein-proteinové a Protein-Lipidové interakční metody (Y2H, afinitní purifikace, pull-downy, PIP strip, LUVy)
- Konfokální mikroskopie

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Experimental Plant Biology**

Ph.D. study program: Anatomy and Physiology of Plants

Summary of the Ph.D. Thesis



Effectors of Rab GTPases and Their Role in Plant Secretion

Mgr. Martina Růžicková

Supervisor: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Supervisor-consultant: Doc. RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Prague, March (2017)

Table of Contents

ABSTRACT.....	3
INTRODUCTION	4
Rab GTPases	4
Exocyst as an Effector of Rab GTPases	4
Proteins Moderating Rab GTPases Functions	5
REP and GDI Proteins.....	5
Rab Geranylgeranyl Transferase	5
Classification of RAB GTPases	5
1. Functional Characteristics of the Exocyst Complex	6
2. Phenotype of Exocyst Mutants.....	6
MATERIALS AND METHODS	7
1. Plant Exocyst Complex is an Effector of small GTPases from RABA4 Class	8
2. Interaction of the EXO70A1 Exocyst Subunit with the Phospholipids <i>in vitro</i>	8
3. Developmental plasticity of <i>Arabidopsis</i> Hypocotyl is Dependent on Exocyst Complex Function	9
4. Starch Accumulation in <i>Arabidopsis</i> Secretory Mutants Seedlings is a Result of the Cell Wall Biogenesis Inhibition	9
5. Mutant in SEC15b Exocyst Subunit.....	10
6. Rab GTPases as Potential Targets in Plant Biotechnologies.....	10
CONCLUSIONS.....	11
REFERENCES	12
Curriculum Vitae	14

ABSTRACT

Rab GTPases are small signaling molecules that play an important role in vesicle trafficking in eukaryotic cells. Correct signaling through small GTPases allows orchestration of vesicle transport among cellular organelles and also to the cell wall providing cell wall material for cell growth and elongation. Engagement of Rab GTPases in the regulation of endomembrane trafficking is one of the evolutionary conserved aspects of secretion regulation. The network of Rab GTPases interaction includes also various downstream effectors. One of them is the exocyst complex involved in vesicle docking at the plasma membrane. It is a complex composed of eight different subunits (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84). Exocyst was discovered as Sec4p Rab GTPase effector in yeast and also data from animal models describe the Sec15 exocyst subunit as the Rab-interacting partner, but data from plants are missing. On the other hand, numerous studies identified exocyst role in tip growth of pollen tube and root hairs, seed coat formation, cell plate and cell wall formation, hypocotyl elongation, and importantly also PIN auxin efflux carriers recycling and polar auxin transport. There are two paralogues of SEC15 in the *Arabidopsis* genome, SEC15a and SEC15b, the previous one already shown to be important for polarized pollen tube growth.

In this thesis, we first test the hypothesis of conservation of Rab-exocyst interaction in *Arabidopsis thaliana*. Using *in vitro* and *in vivo* techniques, we were able to show interaction of SEC15b with RAB GTPases from the RAB-A4 subgroup. Our experimental data suggest an intriguing possibility that RAB GTPases from the RAB-A4 subgroup are not redundant in respect to interaction with exocyst.

The exocyst complex was proven to be important for hypocotyl elongation, thus we use etiolated *Arabidopsis* hypocotyl, a flexible connection between root and cotyledons, as a model system. Morphological, anatomical and cytological analyses of *Arabidopsis* mutants in several exocyst subunits, including SEC15, showed formation of a discrete region on the etiolated hypocotyl near the root-hypocotyl junction, overall morphology of which resembles the collet region. The collet region, root-hypocotyl junction, is an important transition zone between different environments. Despite its crucial importance for plant development, little is known about how this transition zone is specified. We also describe and discuss other aspects of the SEC15b mutation in *Arabidopsis* and redundancy of both SEC15 paralogues.

Homozygous *rgtb1-1* mutant plants that are defective in RAB GTPase geranylgeranylation are characteristic by short etiolated hypocotyls with irregular cell pattern and heavy starch accumulation. To address this phenomenon, we show that etiolated hypocotyls upon isoxaben treatment generally react on distortion of the cell wall expansion on saccharides-containing media by allocation of sugars in the form of starch accumulation. We also used different mutant lines that are defective in cellular transport showing very similar phenotype to wild-type plants treated with isoxaben. Moreover, we discovered that there is a switch mechanism redirecting the sink of internal sugars from the cell wall synthesis to starch accumulation.

At the end, we also shortly discuss potential of Rab GTPases as targets of biotechnologies.

INTRODUCTION

The whole process of vesicular transport starts with vesicle budding driven by a coat assembly, which distorts a membrane of a donor organelle. There are at least three types of proteins that coat the vesicular surface by reversible polymerization called vesicular coatomers. First, vesicles that move from the plasma membrane and TGN compartment toward vacuole are coated with clathrin protein. Second, vesicles from ER to Golgi network have COPI coat. And third, vesicles that mediate retrograde transport from Golgi to ER are coated with COPII coat. The coat assembly is regulated with GTP-binding proteins (Arf, Sar and also Rab proteins).

The next step of vesicular transport is vesicle trafficking during which the created vesicle is transported toward the target membrane. The vesicle delivery is mediated by actin filaments and microtubules (cytoskeleton), which facilitate vesicle transport. The necessity for the high specificity of different molecular motors attachments to the cytoskeleton is assured by Rab GTPases (Seabra and Coudrier, 2004). Prior to the membrane fusion, the vesicle has to be uncoated, because vesicle coat complexes interfere with the membrane fusion process. In mammals, an example of the regulation of this process by Rab5 GTPase is known (Semerdjieva et al., 2008).

When the vesicle is approximately 40 - 50 nm distant from the target membrane, tethering complexes recruited by Rab GTPases interact with the vesicle and bring it near the target membrane. In the last step the vesicle is fused with the target membrane. This is mediated by N-ethylmaleimidesensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex.

Rab GTPases

Rab GTPases are small monomeric G proteins, whose role is regulation of vesicle transport inside a cell. Rab GTPases belong to the Ras protein superfamily, which also contains Ras, Ran, Rho and Arf protein families, that all have the same catalytic activity and structural features but differ in their function inside the cell.

As molecular switches, Rab GTPases cycle between two states, GTP-bound and GDP-bound. GTP-bound is considered as active and GDP-bound as inactive (Stenmark et al. 1994). The Rab GTPase's transition from the GDP-bound to the GTP-bound form, requires regulatory proteins that are known as Guanine nucleotide Exchange Factors (GEFs). Once in the GTP-bound form, Rab GTPases are able to interact with their effector proteins (e.g. tethering factors).

Even though Rab GTPases are able to hydrolyse GTP, they are not very effective in it (Pan et al. 2006). Therefore, they need another regulatory proteins, GTPase Activating proteins (GAPs), to make the hydrolysis more effective.

Exocyst as an Effector of Rab GTPases

Exocyst, a multiprotein tether complex highly conserved across almost whole eukaryotic kingdom (Heider et al. 2012), was first discovered as an effector of Rab GTPases in yeasts (TerBush et al. 1996). It operates approximately 40 - 50nm from the plasma membrane. At this distance it is able to catch secretory vesicles and drag them to the closer proximity of the plasma membrane (around 10nm) and simultaneously to the vicinity of SNARE proteins, which mediate fusion of the vesicle with the plasma membrane (Chen et al. 2001).

To be able to exert the full role in the cell, exocyst has to perform subsequent steps. It has to create a functional complex in the place of its function and interact with the plasma membrane and with a secretory vesicle. The order of these events is not known yet.

Proteins Moderating Rab GTPases Functions

REP and GDI Proteins

These two proteins are an integral part of the Rab GTPase cycle and are structurally and functionally related (Seabra et al. 1998). The GDI and REP proteins are important during the Rab GTPase posttranslational modification that is mediated by RabGGT enzyme. These proteins also help the Rab GTPase to complete the whole GDP-GTP cycle.

Rab Geranylgeranyl Transferase

RabGGT is unique in the protein prenyl transferase family, because it modifies only members of a single protein subfamily - Ras-related Rab GTPases.

Most of them possess a variable C-terminus with two cysteine residues arranged in the motifs such as -CC, -CXC, -CCX, -CCXX and RabGGT enzyme catalyzes transfer of two geranylgeranyl groups to these two cysteine residues (Farnsworth et al. 1994). The process of Rab GTPase geranylgeranylation requires presence of Rab escort protein (REP), Anant et al. (1998) referred to this process as prenylation cascade.

This cascade starts with REP protein that binds newly synthesized Rab protein and forms a stable Rab-REP complex. After that, a RabGGT enzyme is able to recognize a Rab-REP complex as its protein substrate and mediates a transfer of geranylgeranyl moieties to the relevant cysteine residues.

Finally, geranylgeranylation Rab GTPase is able to bind biological membranes (Alexandrov et al. 1994).

Classification of RAB GTPases

Rab GTPases can be found in almost all eukaryotic organisms. In yeasts, Rab GTPases are named historically with regards to their discovery. In *Drosophila* and animals, they are classified numerically, but in *Arabidopsis thaliana* their classification is based on letters of the alphabet and they are denoted from A to H (Rutherford et al. 2002).

For instance, 57 RAB GTPases have been identified in the *Arabidopsis* genome (Pereira-Leal et al. 2001) that can be grouped into 8 groups (Bischoff et al. 1999), from which 6 are related to subgroups known in yeasts and animals. The remaining two groups are related to the mammalian Rab2 and Rab18 subgroups which cannot be found in yeasts (Lazar et al. 1997). Here we focus on RAB GTPases that play some role in vesicular trafficking towards the PM, i.e. those belonging to the first six groups.

AIMS OF THE STUDY

Ph.D. Thesis: ' Effectors of RAB GTPases and their role in plant secretion' has two main aims further described in this chapter. The first focused on the exocyst on the molecular level and tried to answer questions about its functional characteristics. Second part focused on the phenotypic effect of the mutation in various exocyst subunits. This task was solved on the physiological level, predominantly.

1. Functional Characteristics of the Exocyst Complex

Interaction of the Exocyst complex with the secretory vesicles

- What is the connection between tethering complex exocyst and secretory vesicle mediated?

Interaction of the Exocyst complex with the plasma membrane

- How EXO70A1 exocyst subunit interacts with the phospholipids?

2. Phenotype of Exocyst Mutants

Plasticity of exocyst mutant hypocotyls

- Is there common secretory phenotype for mutants in different exocyst subunits?

Specific accumulation of starch in the hypocotyls of dark-grown exocyst mutants

- Do the secretory mutants have a problem with the hypocotyl elongation and over-accumulation of starch when grown in the dark? Does the decision mechanism of plant 'to grow or to store' exist?

Mutant in SEC15b subunit

- How does the mutant in SEC15b subunit of the exocyst complex look like?

MATERIALS AND METHODS

Overview of materials and methods used in this Ph.D.thesis

- *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*,
- *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*
- gene cloning and construct preparation
- Yeast-two-hybrid (Y2H) assay
- Yeast complementation
- co-immunoprecipitation
- protein expression and purification
- pull-down assay and western blot analysis
- PIP/Lipid membrane strip, Large Unilamellar Vesicles (LUV) method
- Lugol staining, Starch assay kit (Abcam),
- microscopy, fluorescent microscopy FLIM/FRET
- ImageJ, Inkscape, GIMP.

RESULTS

1. Plant Exocyst Complex is an Effector of small GTPases from RABA4 Class

Martina Ružicková^{1,2,3}, Klára Aldorfová^{1,2}, Siarhei Dobrovolski⁴, Viktor Žárský^{1,2}, Jan Hejátko⁴ and Michal Hála^{1,2*}

Abstract:

Engagement of RAB GTPases in the regulation of endomembrane trafficking is one of the evolutionary conserved aspects of secretion regulation. RAB GTPases are regulatory switches orchestrating vesicle transport among cellular endomembrane compartments and towards the plasma membrane via downstream effectors.

One of them is the exocyst complex involved in vesicle docking at the plasma membrane. It is a complex composed of eight different subunits (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84) that occurs in almost all eukaryotes. Exocyst was discovered as a Sec4p Rab GTPase effector in yeast and data from animal models suggest SEC15 exocyst subunit as the RAB-interacting partner. However, the interaction of the exocyst with the RAB GTPases has not been shown in plants.

Here we test the hypothesis of conservation of RAB-exocyst interaction in *Arabidopsis thaliana*. We expressed the SEC15b subunit, one of two paralogous subunits of the exocyst complex as recombinant protein and transiently as GFP-SEC15b fusion protein in *Nicotiana benthamiana*.

Both *in vitro* and *in planta*, we were able to show interaction of SEC15b with RAB GTPases from the RAB-A4 subgroup. Interestingly, RAB-A4a and -A4b but not RAB-A4c and -A4d were shown to be interactors of the SEC15b subunit.

2. Interaction of the EXO70A1 Exocyst Subunit with the Phospholipids *in vitro*

How EXO70A1 exocyst subunit interacts with the phospholipids?

The interaction of exocyst complex with the phospholipids of plasma membrane is a very up-to-date topic solved in our laboratory.

The EXO70A1 subunit which was published as ubiquitously expressed in all tissues (Synek et al., 2006). The interaction between EXO70 subunit and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI4,5P2) phospholipid on the plasma membrane is already known from the yeast model (He et al., 2007).

My task was to express and purify Exo70A1 construct and point-mutated version - Exo70A1-5xE and test the ability and specificity of these proteins to bind phospholipids. The first analysis to confirm or reject possible linkage between Exo70A1 subunit and phospholipids was realized by PIP strip method. Exo70A1 construct with His-tag on the N-terminus was purified under native conditions and used for PIP strip analysis. Specific signal of our protein of interest was detected by commercial antibody against the His-tag.

3. Developmental plasticity of *Arabidopsis* Hypocotyl is Dependent on Exocyst Complex Function

Edita Janková Drdová^{1,2}, Martina Růžicková^{1,2}, Karel Janko³, Michal Hála^{1,2}, Hana Soukupová¹ and Viktor Žárský^{1,2}

Abstract:

The collet region, root-hypocotyl junction, is an important transition zone between different environments. Despite its crucial importance for plant development, little is known about how this transition zone is specified. Here we describe the involvement of the exocyst complex in this process. Exocyst is an octameric vesicles tethering complex involved in the secretion and membrane recycling, in plants participating in tip growth of pollen tube and root hairs, seed coat formation, cell plate and cell wall formation, hypocotyl elongation, defense and importantly also PIN auxin efflux carriers recycling and polar auxin transport. In this study morphological, anatomical, and cytological analyses of *Arabidopsis* mutants in several exocyst subunits showed the formation of a discrete region on the etiolated hypocotyl above the regular collet whose overall morphology resembles the true collet region. Penetration of this phenotypic defect is significantly influenced by cultivation temperature and carbon supply, and is related to the defect in auxin regulation. Adventitious roots induction after the dark pretreatment was compromised in the exocyst mutant hypocotyls. These observations open new insights into the regulation of developmental plasticity of the hypocotyl.

4. Starch Accumulation in *Arabidopsis* Secretory Mutants Seedlings is a Result of the Cell Wall Biogenesis Inhibition

Martina Růžicková^{1,2,3}, Edita Drdová¹, Hana Soukupová¹, Viktor Žárský^{1,2} and Michal Hála^{1,2*}

Cell wall biogenesis in plants is very complex process. It also represents important sink for sugars in form of cell wall polysaccharides. For the proper cell wall biogenesis and cell elongation in general, functional secretion is needed. In this study, we were asked the question how plant with the disrupted secretion deal with the unused energy the polysaccharides.

To address this question, we use etiolated *Arabidopsis* hypocotyl, a flexible connection between roots and cotyledons, as a model system. The cells of the hypocotyl undergo rapid elongation in the dark and intensive transport to the cell wall takes place during this process. Secretory mutants, used in this work are characterized by short etiolated hypocotyls with irregular cell pattern and ectopic starch accumulation. To address this phenomenon, we measured the length of hypocotyls of dark grown secretory mutants in comparison with WT plants using normal growing conditions. Subsequently, we correlated the length of the hypocotyls with the starch accumulation. We conducted the same measurement for the plants grown on the media supplemented with the drug isoxaben.

We show that etiolated WT hypocotyls upon isoxaben treatment generally react on distortion of the cell wall expansion on saccharidescontaining media by allocation of sugars in the form of starch accumulation, which is the effect very similar to the starch accumulation of the secretory mutants. Moreover, we discovered that in plant seedlings, there is a switch mechanism redirecting the sink of internal sugars from the cell wall synthesis to starch accumulation.

5. Mutant in SEC15b Exocyst Subunit

How does the mutant in SEC15b subunit of the exocyst complex looks like?

The subsequent mutant lines were ordered from SALK collection : SALK_130663, SALK_042723 and RIKEN_RATHM15-1183-1_H.

The *Arabidopsis* mutant lines were back-crossed to Col0 WT plants and genotyped for T-DNA or transposomal insertion. Insertion in the SEC15b gene and in the SEC15b promoter was confirmed in two *Arabidopsis* lines (SALK_130663 and RATHM15-1_H). This two confirmed lines were further studied. The first genotyping of the RATHM-1183-1_H line showed existence of *sec15b* homozygous plants that did not display any apparent phenotypic effect. Later, the phenotypic effect was visible after the first back-cross to the background Col0. The T-DNA insertional line SALK_130663 was genotyped and in the population of 320 plants was found 51 homozygous plants that displayed visible phenotype. Phenotype was noticeable in the 4-weeks old light grow plants, when the plants started to switch from vegetative to generative phase. There was disturbed apical dominance and plants were half size of the WT plant. Also some spots were visible on the leaves, that might be of autophagic origin.

In the dark, phenotype of *sec15b* was visible immediately. Dark-grown seedlings were not able to elongate their hypocotyls properly and created second ectopic collette-hair like region. The phenotype of ectopic collette-hair like region was also observed in other exocyst mutant and is described to more detail in the publication 'Developmental plasticity of *Arabidopsis* hypocotyl is dependent on exocyst complex function', that is included in this disertation. More over, *sec15b* mutant plants show heavy accumulation of starch granules in this part of hypocotyl. Starch accumulation is dedicated in the manuscript 'Starch accumulation in *Arabidopsis* secretory mutants seedlings is a result of the cell wall biogenesis inhibition' that is also part of this thesis.

sec15b hmozygous plants SALK and RIKEN lines were confirmed to be knock-outs.

6. Rab GTPases as Potential Targets in Plant Biotechnologies

Martina Ružicková^{1,2} and Michal Hála^{*1,2}

Plants are not only a food resource but are also a valuable source of different materials. Plant biotechnologies help improve food or material yield and increase the number of compounds obtained from plants. Affecting plant secretory machinery is one of the ways we can modify plant bio-production.

Rab GTPases are important organizers of vesicle transport through their cycling between GDP- and GTP-bound forms as well as between membrane compartments. Here, we discuss whether RAB GTPases can be targets for biotechnology research. We focus on the involvement of RAB GTPases in plant stress responses and cell wall biogenesis, which are two aspects that highly influence plant development.

We conclude is that the complexity of RAB GTPase families and their regulation make these proteins difficult targets for biotechnologies.

CONCLUSIONS

The whole dissertation work is focused on the exocyst complex as an effector of RAB GTPases mainly. In more detail, we raveled and discussed the aspects of mutation of different exocyst subunits and mutations of RAB GTPases and what connects them together. We also correlated the phenotypic defect of exocyst mutants with the starch accumulation and therefore we linked it with the sugar metabolism.

1. In the first part, we focused on the functional characteristics of the exocyst complex. In particular, we described how the interaction of the tethering exocyst complex with the secretory vesicle is mediated. Even though the interaction of the exocyst complex with Rab GTPases is known from the other organisms, the situation in plants has not been observed yet. Because of the previous unsuccessful attempts to find an exocyst interacting RAB GTPase, the direct interaction with the phospholipids of the vesicle and also indirect interaction via RAB GTPases was considered. Using co-immunoprecipitation and pull-down assays we were able to identify two exocyst interacting RAB GTPases from the class A in our model plant *Arabidopsis thaliana*. Moreover, we were able to conclude that SEC15b subunit of the exocyst complex is not able to interact with the phospholipids of the membranes. This was achieved by using lipid binding assay. This result shows the conservation of the exocyst complex, where the interaction with the transported vesicle occurs through RAB GTPases signaling molecules in plants as was shown also in other eukaryotes.

2. We also tested other exocyst subunit for the interaction with phospholipids. We chose EXO70A1 subunit that together with SEC3 subunit mediates the interaction of the exocyst with the plasma membrane in other eukaryotes. Our results show that EXO70A1 subunit interacts with phospholipids. Moreover, there is a preferential interaction of EXO70A1 with the Phosphatidic Acid (PA) *in vitro*. This observation is included in this thesis and will be part of the publication about the interaction of the exocyst complex with the membranes. Obviously, we are aware, that all results that are performed *in vitro* has to be shown *in vivo* and/or *in planta* to cover and unravel the correct mechanism. Therefore, it is necessary to compare and confirm our *in vitro* results with *in vivo* studies.

3. The second part of this thesis raveled and discussed the aspects of mutation of different exocyst subunits. There are two manuscripts, which resulted from this work. The first manuscript focuses on the yet unseen phenotypic defect, which is a very specific conditional phenotype localized in the hypocotyl/collete hair region of dark-grown exocyst mutants.

4. The second manuscript follows the previous observations and focuses on the aspect of the starch accumulation in the hypocotyl of dark-grown secretory mutants and shows that there is a decision mechanism in plants which we call 'to store or to grow'.

5. The last section of the work shows the *Arabidopsis* mutant in the SEC15b subunit of the exocyst complex. This result will be part of the other publication.

REFERENCES

- Alexandrov K., Horiuchi H., Steele-mortimer O., Seabral M. C., and Zerial M. (1994). "Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes". In: *EMBO J* 13.22, pp. 5262–5273.
- Anant J. S., Desnoyers L., Machius M., Demeler B., Hansen J. C., Westover K. D., Deisenhofer J., and Seabra M. C. (1998). "Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex." In: *Biochemistry* 37.36, pp. 12559–12568.
- Bischoff F., Molendijk A., Rajendrakumar C., and Palme K. (1999). "GTP-binding proteins in plants." In: *Cell Mol Life Sci* 55.2, pp. 233–256.
- Farnsworth C. C., Seabrat M. C., Ericsson L. H., Gelbt M. H., John A., and Imi G. (1994). "Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A." In: *PNAS* 91.25, pp. 11963–11967.
- He B., Xi F., Zhang X., Zhang J., and Guo W. (2007). "Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane". In: *The EMBO journal* 26.18, pp. 4053–4065.
- Heider M. R. and Munson M. (2012). "Exorcising the exocyst complex". In: *Traffic* 13.7, pp. 898– 907.
- Chen Y. A. and Scheller R. H. (2001). "SNARE-mediated membrane fusion". In: *Nature reviews Molecular cell biology* 2.2, pp. 98–106.
- Lazar T., Gotte M., and Gallwitz D. (1997). "Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?" In: *Trends Biochem Sci* 22.12, pp. 468–472.
- Pan X., Eathiraj S., Munson M., and Lambright D. G. (2006). "TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism". In: *Nature* 442.7100, pp. 303–306.
- Pereira-Leal J. and Seabra M. (2001). "Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins." In: *J Mol Biol* 313.4, pp. 889–901.
- Rutherford S. and Moore I. (2002). "The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation". In: *Current Opinion in Plant Biology* 5.6, pp. 518–528.
- Seabra M. C. (1996). "Nucleotide Dependence of Rab Geranylgeranylation Rab escort protein interacts preferentially with GDP-bound Rab". In: *Journal of Biological Chemistry* 271.24, pp. 14398–14404. — (1998). "Membrane Association and Targeting of Prenylated Ras-like GTPases". In: *Cell Signal* 10.3, pp. 167–172.
- Seabra M. C. and Coudrier E. (2004). "Rab GTPases and myosin motors in organelle motility". In: *Traffic* 5.6, pp. 393–399.

Semerdjieva S., Shortt B., Maxwell E., Singh S., Fonarev P., Hansen J., Schiavo G., Grant B. D., and Smythe E. (2008). "Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6". In: *The Journal of cell biology* 183.3, pp. 499–511.

Stenmark H., Parton R. G., Steele-Mortimer O., Lütcke A., Gruenberg J., and Zerial M. (1994). "Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis." In: *The EMBO journal* 13.6, p. 1287.

Synek L., Schlager N., Eliáš M., Quentin M., Hauser M.-T., and Žárský V. (2006). "AtEXO70A1, a member of a family of putative exocyst subunits specifically expanded in land plants, is important for polar growth and plant development". In: *The Plant Journal* 48.1, pp. 54–72.

TerBush D. R., Maurice T., Roth D., and Novick P. (1996). "The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*." In: *The EMBO journal* 15.23, p. 6483.

Martina Růžicková – Curriculum Vitae

Personal information:

Email ruzickova@ueb.cas.cz
Phone number +420 776 570 858
Address Institute of Experimental Botany AS CR, v. v. i.
Rozvojová 263
165 02 Prague 6 - Lysolaje
Czech Republic

Research Interests:

Plant Cell biology is an area of biological research within which I would like to further develop the skills and knowledge acquired in my recent research career. I have been fortunate throughout my PhD to have worked on membrane trafficking and cell signalling, an aspect of cell biology that I find particularly fascinating. I am extremely keen to progress my career as a postdoctoral researcher and broaden my interests towards different research topics, approaches, and techniques.

Education and Employment:

2017 – present: **Research Assistant**, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom . Laboratory of Plant Physiology and Biophysics. Main interest: Membrane trafficking, Electrophysiology.

2011 – 2017: **PhD period**, Charles University, Prague, Czech Republic. Laboratory of Cell Biology. PhD thesis: Interactors of Rab GTPases and their role in plant secretion.

2010 – 2011 **Research Internship**, Charles University, Prague, Czech Republic., Laboratory of RNA Biochemistry. Project: HCV and cap independent translation initiation after ribosome binding to the internal ribosome entry site.

2007 – 2010 **MSc. in Molecular Biology and Genetics**, Masaryk University, Brno, Czech Republic. National Center For Biomolecular Research, Master thesis: Preparation and characterization of selected proteins included in RNA degradation.

2003 – 2007 **Bsc. in Biology** - University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Czech Republic. Laboratory of Plant Virology.

Bachelor thesis: PCR detection of Phytoplasmas in plant host
Catharanthus roseus.

Publications and manuscripts in preparation:

- Molecular identification of phytoplasmas in cultivar collection and production plantations of apple and pear trees in the Czech republic. Fránová J., Petrzik K., Růžicková M., Paprštejn F., Kučerová J. (2008). Acta Horticulturae, 781: 359-368.
- Developmental plasticity of Arabidopsis hypocotyls is dependent on exocyst complex function. Janková-Drdová E., Růžicková M., Janko K., Hála M., Soukupová H., Žárský V. , Prepared for re-submission. Expected 2016.
- Analysis of hypocotyls length and starch accumulation in dark-grown Arabidopsis plants under the isoxaben treatment. Růžicková M., Janková-Drdová E., Žárský V. and Hála M., manuscript in preparation. Expected 2017.
- Molecular Molecular mechanism of SEC15B function is evolutionary conserved and involve interaction with RAB GTPases. Růžicková M., Aldorfová K., Žárský V. and Hála M., Expected 2017.
- Characterization of SEC15b subunit of the exocyst complex. Aldorfová K. and Růžicková M., Žárský V., Hála M. Expected 2017.
- Interaction of the EXO70A1 exocyst subunit with the plasma membrane in plant cells. Synek L., Pleskot R., Růžicková M., Vukašinovič N., Žárský V., Potocký M. Expected 2017.

Conferences and Courses:

- September 2016, European Network for Plant Endomembrane Research Meeting (ENPER), Bordeaux, France, Poster presentation.
- July 2015, Society of Experimental Biology Conference in Prague, Prague, Czech Republic, Poster presentation.
- September 2014, European Network for Plant Endomembrane Research Meeting (ENPER), Lecce, Italy, Oral presentation.
- September 2014, 12th PhD Student Conference of Plant Experimental Biology, Olomouc, Czech Republic, Oral presentation.

- August 2012, 15th European Network for Plant Endomembrane Research Meeting (ENPER), Madrid, Spain, Oral presentation.
- March 2011, The Student Scientific Conference on Biotechnology and Biomedicine, Brno, Czech Republic, Oral presentation.
- September 2011, Cell Section Symposium: Exocytosis in Animals, Fungi and Plants, London, Great Britain, Poster presentation.
- September 2006, XVII. Czech and Slovak conference, Prague, Czech Republic, Oral presentation.
- September 2012, Proteomics in Practice, Brno, Czech Republic. Course of 2DE and characterization of proteins by MS.

Teaching:

2011 - 2016 Guidance of bachelor and master students.

2012 - 2014 Practical Course of Plant Physiology (annual laboratory course at Faculty of Science, Charles University).

Laboratory techniques:

- Cultivation and handling of model organisms (plants, yeasts, bacteria)
- Molecular biology methods (cloning, DNA and RNA isolation, PCR, Southern blot, RT qPCR, Northern blots)
- Bacterial and yeast protein expression, purification and renaturation
- Protein chemistry methods (SDS-PAGE, Native, and 2D- Electrophoresis, Western Blotting)
- Protein-protein and Protein-Lipid interaction assays (Y2H, affinity purifications, pull-downs, PIP strips, LUVs)
- Confocal Microscopy